

(19)



Octrooiraad
Nederland

(11) Publikatienummer: 9301525

(12) A TERINZAGELEGGING

(21) Aanvraagnummer: 9301525

(22) Indieningsdatum: 03.09.93

(51) Int.Cl.⁶:
A23C 19/032, A23C 9/123,
C12N 1/20, C12N 9/54,
C12N 15/75, A61K 35/66

(43) Ter inzage gelegd:
03.04.95 I.E. 95/07

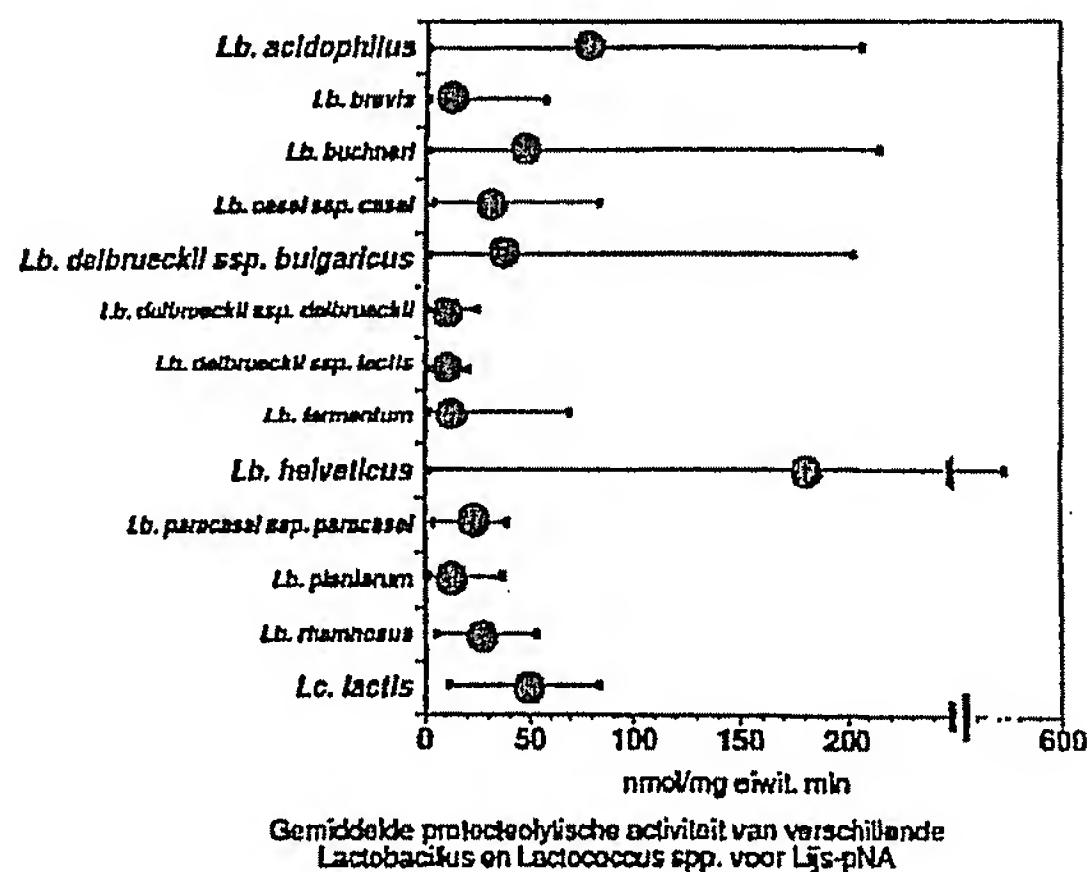
(71) Aanvrager(s):
Snow Brand European Research Laboratories
B.V. te Groningen

(72) Uitvinder(s):
Paris Som Tjwan Tan te Haren. Masahiro Sasaki
te Paterswolde. Boukje Wendelina Bosman
te Groningen

(74) Gemachtigde:
Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 97
2587 BN 's-Gravenhage

(54) Nieuwe *Lactobacillus*-stammen, eiwitten en sequenties daarvan, alsmede werkwijzen voor de toepassing van deze stammen, eiwitten en sequenties

(57) De uitvinding betreft een nieuwe *Lactobacillus*-stam, enzymen en andere eiwitten verkregen met die stam, nucleotide sequenties die coderen voor dergelijke eiwitten, enzymen of andere delen van het *Lactobacillus* organisme en toepassingen van de organismen, de enzymen en/of andere eiwitten, alsmede de nucleotide sequenties. In de zuivelindustrie worden Lactococci veelvuldig toegepast als organismen deel uitmakend van een startculture. Met name de omzetting van verse kaas wrongel naar rijpe kaas wordt bepaald door de proteolytische afbraak van caseïne met behulp van deze Lactococci startcultures. Bij de rijping van een aantal soorten kaas ontwikkelen zich in situ echter cultures van *Lactobacillus* soorten. Kennelijk spelen deze soorten wel een rol bij de rijping van die kaas-soorten. De uitvinding voorziet in een nieuwe *Lactobacillus*-stam die een proteolytisch systeem bevat met een hogere activiteit dan alle andere lactobacilli tot nog toe bekend en een hogere activiteit dan de meeste andere melkzuurbacteriën, inclusief een aantal Lactococci.



NLA 9301525

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Titel: Nieuwe Lactobacillusstammen, eiwitten en sequenties
daarvan, alsmede werkwijzen voor de toepassing van
deze stammen, eiwitten en sequenties

De uitvinding heeft betrekking op een nieuwe Lacto-
bacillus-stam, enzymen en andere eiwitten verkregen met die
stam, nucleotide sequenties die coderen voor dergelijke eiwit-
ten, enzymen of andere delen van het Lactobacillus organisme
5 en toepassingen van de organismen, de enzymen en/of andere ei-
witten, alsmede de nucleotide sequenties.

Melkzuurbacteriën worden gebruikt bij de fermentatie van
een groot aantal produkten, met name bij de fermentatie van
voedingsmiddelen. Vroeger was de belangrijkste eigenschap van
10 deze bacteriën dat zij aanwezige koolhydraten (suikers) kunnen
omzetten in melkzuur, waardoor het gefermenteerde produkt
beter geconserveerd was.

In de huidige processen in de zuivelindustrie zijn andere
eigenschappen, zoals het ontwikkelen van een smaak en een con-
15 stante kwaliteit van het produkt minstens even belangrijk
geworden.

Om zuivelprodukten met al de gewenste eigenschappen door
fermentatie te verkrijgen, zijn specifieke startcultures die
een mengsel van verschillende micro-organismen omvatten, ont-
20 wikkeld. Micro-organismen met speciale eigenschappen zijn
daarom van groot belang voor de zuivelindustrie.

Bijvoorbeeld bij de bereiding van kaas, waar de rijping
van enkele weken tot twee jaar in beslag kan nemen, afhanke-
lijk van de soort kaas.

25 Dat brengt hoge kosten met zich mee door de gekoelde op-
slag over een langere termijn, immobilisatie van kapitaal en
produktieverliezen ten gevolge van atypische fermentatie,
waardoor bijvoorbeeld een bittere smaak ontstaat.

Een versnelling van het rijpingsproces zou een aanzien-
30 lijke kostenbesparing op kunnen leveren.

Lactococci worden in de zuivelindustrie veelvuldig toe-
gepast als organisme deel uitmakend van een startculture. Met

9301525

name de omzetting van verse kaas wrongel naar rijpe kaas wordt bepaald door de proteolytische afbraak van caseïne met behulp van deze Lactococci startcultures.

Het proteolytische systeem van deze Lactococci bestaat
5 uit een aantal proteïnases en een aantal peptidases en is onderwerp geweest van een aantal studies (Tan, P.S.T et al, J.Dairy Res. 60 p.269-286, 1993 en Visser, S., J.Dairy Sci. 76, p.329-350, 1993).

In tegenstelling tot bovengenoemde Lactococcus stammen
10 worden Lactobacillus soorten gewoonlijk niet als startcultures in de rijping van kaas toegepast.

Bij de rijping van een aantal soorten kaas ontwikkelen zich in situ echter cultures van Lactobacillus soorten. Kennelijk spelen deze soorten wel een rol bij de rijping van die
15 kaassoorten (Marth, E.H., J.Dairy Sci. 46, p.869-890, 1963 en Peterson et al, J.Dairy Sci. 73, p.1395-1410, 1990).

Verder wordt verondersteld dat een aantal Lactobacillus soorten een hoge proteolytische activiteit bezitten (Arora et al, J.Dairy Sci.73, p.264-273,1990a) en dat het vermogen van
20 deze Lactobacillus soorten om peptiden te hydrolyseren nodig is om de ophoping van bittere peptiden in kaas te voorkomen. Een aantal proteolytische enzymen van Lactobacillus is bestudeerd (3, 4, 5, 6, 16, 17, 21, 22, 23, 24 en 30)

De uitvinding voorziet in een nieuw micro-organisme dat
25 een proteolytisch systeem bevat met een hogere activiteit dan alle andere Lactobacilli tot nog toe bekend en een hogere activiteit dan de meeste andere melkzuurbacteriën, inclusief een aantal Lactococci.

Het nieuwe micro-organisme wordt gekenmerkt door een
30 unieke combinatie van eigenschappen die het zeer geschikt maakt voor de toepassing bij fermentatieprocessen, met name voor de rijping van kaas.

Karakteristieken van het nieuwe micro-organisme zijn onder andere in vergelijking met andere enigszins vergelijk-
35 bare micro-organismen van hetzelfde geslacht of van het

9301525

geslacht *Lactococcus*, weergegeven in de figuren 1a t/m c, figuren 2 en 3, tabel 2 en tabel 6.

Het nieuwe micro-organisme is onder Art 22B van de ROW en het verdrag van Boedapest gedeponneerd bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures te Baarn onder nummer CBS 404.93 (art. 31F lid 3 van het octrooiereglement is van toepassing).

In het kort komen de eigenschappen van het nieuwe micro-organisme op het volgende neer.

Lactobacillus Helveticus (interne code SBT 2171) vormt regelmatige gram-positieve staafjes, kan anaeroob groeien, is obligaat saccharoclastisch, kan glucose, mannose, galactose en lactose als substraat gebruiken en vertoont een gemiddeld zeer hoge proteolytische activiteit.

Deze proteolytische activiteit komt met name tot uiting in het ontbitteren van een tryptisch afbraakprodukt van caseïne (de zogenaamde bittere peptiden in kaas).

Naast het micro-organisme zelf dat door de uitvinding beschikbaar wordt, voorziet de uitvinding ook in de toepassing van dat organisme of delen daarvan in bijvoorbeeld fermentatieprocessen of proteolytische stappen in processen.

Bij fermentatieprocessen worden de organismen volgens de uitvinding bijvoorbeeld als onderdeel van een startculture voor de rijping van kaas gebruikt, maar ook kunnen de organismen volgens de uitvinding in een later stadium dan als startculture worden toegevoegd. Daarnaast worden de micro-organismen bijvoorbeeld gebruikt voor de proteolyse van biologisch actieve peptiden, zoals bijvoorbeeld neuropeptiden, endorfines, LHRH, ACTH, etc.

Ook kunnen ze gebruikt worden voor andere hydrolyses van eiwitten, bijvoorbeeld voor voedingspreparaten.

Naast de toepassing van de micro-organismen op zich kunnen, zoals eerder gesteld ook delen van de micro-organismen worden toegepast. Met name geldt dit voor de nieuwe eiwitten volgens de uitvinding die afkomstig zijn van het nieuwe organisme. Onder die nieuwe eiwitten worden ook actieve frag-

9301525

menten van deze eiwitten of derivaten, fusies en/of mutanten van deze eiwitten begrepen die

Vergelijkbare activiteit bezitten. De nieuwe eiwitten volgens de uitvinding kunnen alleen of in combinatie met
5 andere eiwitten (al of niet volgens de uitvinding) worden toegepast in allerlei splitsingen van eiwitten en/of peptiden. Bijzondere voorkeur verdient het bij bijvoorbeeld de rijping van kaas om een combinatie van peptidasen en proteïnasen volgens de uitvinding te gebruiken.

10 Daarnaast kunnen de eiwitten volgens de uitvinding ook worden toegevoegd aan conventionele startcultures, bijvoorbeeld zoals die op basis van Lactococcussoorten.

Ook kunnen de nieuwe eiwitten volgens de uitvinding, net als de micro-organismen ook apart voor andere proteolytische
15 doeleinden worden toegepast, zoals bijvoorbeeld bij de proteolyse van biologisch actieve peptiden zoals LHRH, ACTH, endorfines, etc.

Tegen de eiwitten en andere delen van de micro-organismen kunnen antilichamen worden opgewekt. Deze antilichamen behoren
20 ook tot de uitvinding. Zij kunnen bijvoorbeeld worden toegepast om bepaalde proteolytische activiteiten van het nieuwe micro-organisme, die onder sommige omstandigheden misschien minder gewenst kunnen zijn, te onderdrukken.

Daarnaast kunnen zij toegepast worden bij de opzuivering
25 van de eiwitten volgens de uitvinding, middels affiniteitschromatografie.

Ook kunnen zij gebruikt worden bij het opsporen (de detectie) van micro-organismen volgens de uitvinding. Dit kan nuttig zijn bij het zoeken naar verdere geschikte Lactobacillus
30 stammen en bijvoorbeeld bij de kwaliteitscontrole van het eindprodukt.

Methodes om antilichamen op te wekken, mogen als standaardtechnieken gekenmerkt worden. Over het algemeen wordt een zoogdier, meestal een knaagdier ingespoten met een preparaat waar-
35 tegen antilichamen opgewekt moeten worden, over het algemeen in combinatie met een adjuvans.

9301525

Na een aantal herhaalde injecties (boosters) is over het algemeen een voldoende hoge antilichaamtiter bereikt. De antilichamen kunnen dan uit de ascites gezuiverd worden. Tegenwoordig wordt er vaak voor gekozen om monoclonale antilichamen te produceren. Voor deze antilichamen geldt hetzelfde immunisatieschema. Alleen worden nu de miltcellen van het geïmmuniseerde dier verwijderd en gefuseerd met een myeloma, of geïmmortaliseerd met behulp van een virus transformatie (bijvoorbeeld EBV). Hierdoor wordt een continue bron van antilichamen met een identieke specificiteit en affiniteit verkregen.

Waar in deze aanvraag antilichamen worden genoemd worden daar zowel polyclonale- als monoclonale antilichamen, alsmede antigeen bindende fragmenten daarvan begrepen. Er zijn inmiddels vele technieken bekend om antigeen bindende fragmenten te verkrijgen.

Fab fragmenten en Fab'2 fragmenten kunnen eenvoudig door chemische splitsing verkregen worden. Kleinere bindende fragmenten tot en met MRU's (Molecular Recognition Units: bestaan slechts uit een CDR (complementarity determining region)) worden meestal via recombinant DNA technieken bereid.

Middels deze recombinant DNA technieken kunnen ook antilichamen met twee specificiteiten of gekoppeld aan andere eiwitten bereid worden. Al deze, en andere, technieken zijn bruikbaar om antilichamen volgens de uitvinding te verkrijgen.

Recombinant DNA technieken zijn ook zeer geschikt om sequenties van de nieuwe micro-organismen volgens de uitvinding toe te passen. Zo kunnen sequenties die coderen voor proteolytische enzymen in andere cellen dan Lactobacillus tot expressie worden gebracht, zodat een zuiverder preparaat met een hogere opbrengst verkregen wordt. Het tot expressie brengen van een dergelijk eiwit in een gastheercel (bijvoorbeeld E.Coli of andere prokaryoten, Saccharomyces of andere gisten, schimmels, insectecellen, plantecellen en/of zoogdiercellen) gebeurt meestal door de DNA sequentie, die men kan isoleren uit het organisme, of kan verkrijgen door mRNA uit het organisme te isoleren en daarvan cDNA te bereiden, in een

9301525

geschikte vector voor transfectie of transformatie van de gastheercel te brengen onder controle van een aantal geschikte regelementen, zoals promotoren, enhancers, etc.

5 Ook voor deze sequenties geldt weer dat het niet altijd nodig zal zijn om de gehele sequentie coderend voor een eiwit toe te passen. Vaak zal een deel ook de gewenste activiteit kunnen bezitten.

Ook kunnen aan de sequenties volgens de uitvinding andere sequenties gekoppeld worden, bijvoorbeeld om fusie-eiwitten te
10 produceren.

Daarnaast kunnen de sequenties worden toegepast in amplificatietechnieken of hybridisatietechnieken die inmiddels ook wijde bekendheid hebben bij de gemiddelde vakman.

De uitvinding wordt verder toegelicht aan de hand van de
15 volgende voorbeelden.

MATERIAAL EN METHODEN

Organismen

In de voorbeelden werden de volgende Lactobacillus en
20 Lactococcus soorten gebruikt.

Lb. acidophilus, Lb.brevis, Lb.buchneri, Lb.casei ssp.casei, Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus, Lb.delbrueckii ssp.delbrueckii, Lb.delbrueckii ssp.lactis, Lb.fermentum, Lb.helveticus, Lb.paracasei ssp.paracasei, Lb.plantarum,
25 Lb.rhamnosus, Lactococcus lactis ssp.cremoris, Lactococcus lactis ssp.lactis, Lactococcus lactis ssp.diacetylactis. Stammen met een SBT-nummer zijn verkregen van de Snow Brand Type Culture Collection, Tokyo, Japan. Alle typen stammen werden verkregen van de "National Collection of Food Bacteria
30 (NCFB); Agricultural and Food Research Council; Institute of Food Research, Reading, Great Britain. Lactococcus lactis ssp.cremoris AM1, E*, HP, SK112 en Wg2 en Lactococcus lactis ssp.lactis ML3 werden verkregen bij het Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek (NIZO), Ede.

35 De organismen werden routinematig in subculture gehouden (3X) in MRS bouillon (Merck-Darmstadt, Duitsland) bij 30 of

9301525

37°C en als "stock-cultures" bewaard in MRS bouillon met 10% v/v glycerol bij -55°C.

Groeikrommes

- 5 Van elke stam werden groeikrommes verkregen door 1% zaai-culture te enten uit de "stock-culture" in 10 ml MRS of MRX, gevolgd door een tweede enting: de pre-culture, waaruit 1% werd geënt in de groeibuizen (13 x 150 mm) die 10 ml MRS bevatten. De groei werd gevolgd middels meting van de optische
10 dichtheid (OD) bij 650 nm gedurende een aantal uren.

Bereiding van celvrij extract

- De cellen werden gegroeid in MRS bouillon (400 ml), ge-
oogst in de late log fase door te centrifugeren bij 7500 x g
15 gedurende 10 min bij 40 C, gewassen in HEPES (4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazine-ethaansulfonzuur) met 10 mM CaCl₂ bij pH=7 en tenslotte gesuspenseerd in 10 ml HEPES.

- Voor de tweede screening werden de cellen gegroeid in MRX. MRX is MRS aangevuld met 15 mM CaCl₂ en gemodificeerd
20 volgens Hugenholtz et al. (15).

- Celextracten werden verkregen door de cellen te sonifi-
ceren gedurende een aantal perioden van 10 min. (Vibra cell;
Sonics & Materials Inc. Danbury, Connecticut, USA; 50% out-
put, 20% pulse) met intervallen van 10 min. rust bij 0°C.
25 Celvrije extracten werden verkregen door de celmassa 10 min.
bij 30000 x g te centrifugeren bij 40°C.

Enzymbepalingen

- Proteolytische activiteit werd gemeten met een brede
30 variëteit van synthetische en chromogene substraten zoals beschreven voor Lactococcus soorten (zie tabel 1).

De hydrolyse van de p-nitroanilide substraten werd bepaald met de methode van Exterkate (12). De enzymmengsels bevatten 20 µl celextract en 200 µl HEPES (pH 7).

- 35 De reacties werden ingeleid door 200 µl van een 2 mM p-nitroanilide oplossing toe te voegen. Er werd gedurende een aantal minuten bij 30°C geïncubeerd.

9301525

De reacties werden gestopt door 100 μ l 52% (v/v) azijn-
 zuur toe te voegen. De reactiemengsels werden gecentrifugeerd
 bij 1400 rpm gedurende 5 min. De hoeveelheid p-nitroanilide in
 het supernatant werd gemeten bij 410 nm (U-2000 spectrofot-
 5 ometer, Hitachi). De concentratie van het p-nitroanilide werd
 berekend met de molaire absorptiecoëfficiënt (ϵ 8800 $M^{-1}cm^{-1}$).

In sommige gevallen werd het vrijkomen van p-nitroanilide
 continu gemeten.

De hydrolyse van de β -naftylamidesubstraten werd bepaald
 10 met een gemodificeerde methode volgens Elleman (11). Het enzym-
 mengsel bevatte 20 μ l celextract en 200 μ l HEPES 100 mM pH=7.

De reacties werden gestart door toevoegen van 200 μ l van
 een 2 mM β -naftylamide-substraatoplossing in water en er werd
 geïncubeerd bij 30°C gedurende een aantal min. De reacties
 15 werden gestopt door het toevoegen van 200 μ l 1M acetaat, pH=4,
 die 1 mg/ml Fast Garnet GBC?? en 5% (w/v) Brij 35 bevatte. Het
 reactiemengsel liet men gedurende 10 min de optimale kleur-
 ontwikkeling bereiken en daarna werd er gecentrifugeerd op
 14000 rpm gedurende 5 min. De hoeveelheid β -naftylamide in het
 20 supernatant werd berekend met de molaire absorptiecoëfficiënt
 (ϵ 20000 $M^{-1}cm^{-1}$).

De hydrolyse van niet-chromogene synthetische peptiden
 werd bepaald door de hoeveelheid vrijgekomen aminozuren te
 meten met de gemodificeerde cadmium-ninhydrine methode, zoals
 25 beschreven door Doi et al (8). De enzym mengsels bevatten
 100 μ l verdund celextract in 100 mM HEPES pH 7. De reacties
 werden in gang gezet door het toevoegen van 100 μ l van een
 2 mM peptide oplossing en gedurende een aantal minuten bij
 30°C geïncubeerd. De reacties werden gestopt met behulp van
 30 1.5 ml Cd-ninhydrine reagens en daaropvolgend geïncubeerd
 gedurende een aantal min. bij 84°C. Na afkoelen werden de
 mengsels bij 14000 rpm gecentrifugeerd en werd de absorptie
 gemeten bij 515 nm met een Vitalab 10 spectrofotometer (Vital
 scientific, Dieren).

35 De specifieke peptidase-activiteit werd gedefinieerd als
 de hoeveelheid enzym nodig om vanuit het substraat per minuut

9301525

onder de experimentele condities 1 μmol van L-Leucine equivalent aminozuur te produceren (26).

De hydrolyse van resorufine gelabeld caseïne (Boehringer Mannheim GmbH, Duitsland) werd bepaald zoals beschreven in het protocol gegeven door de fabrikant, in 50 mM HEPES bij 37°C.

Alle mengsels werden op 30°C gebracht voordat de reacties werden gestart.

De APIZYM bepaling

De APIZYM kits (LRA ZYM AP 1 tot en met 6) werden verkregen van API SYSTEM (La Balme Les Grottes, Frankrijk). Cel (vrij) extract 70 μl (65 of 125 mg eiwit/ml) werd toegevoegd aan elk van de cups die gedehydrateerd chromogeen enzymsubstraat bevatten, waarna de mengsels gedurende twee of vier uur bij 37°C werden geïncubeerd. De reacties werden ingeleid door het toevoegen van de enzymmengsels, die de chromogene substraten rehydrateerden. Hydrolytische activiteit van de respectievelijke enzymen in de celextracten op het β -naphthylamide-substraat resulteerde in het vrijkomen van de β -naphthylamide-groep. De reactie werd gestopt door het toevoegen 50 μl reagens ZYM A en de kleur werd ontwikkeld door het toevoegen van 50 μl ZYM B. Activiteiten werden bepaald door de kleur die zich in vijf minuten ontwikkelde te vergelijken met de kleurenkaart zoals geleverd door de fabrikant.

25

SDS-PAGE

Natrium dodecyl sulfaat-polyacrylamide gel electroforese (SDS-PAGE) en preparatieve slab gel electroforese werd uitgevoerd met respectievelijk een Mini-Protean II en een Protean II xi (Bio-Rad Laboratoria, Richmond, Californië, Ver. Staten) en uitgevoerd zoals beschreven in de instructies zoals aangeleverd door de fabrikant. De moleculaire afmetingen van de enzymen werden geschat door voorgekleurde SDS-PAGE standaards te gebruiken in het interval van 14.400 tot 97.400 Da (Bio-Rad Laboratoria, Richmond, Californië, Ver. Staten).

9301525

Immunoblotting

Eiwitten, die gescheiden waren op een gel werden overgebracht op vellen polyvinylideendifluoride (PVDF) met een Mini Trans-Blott cel (Bio-Rad Laboratoria, Richmond, Californië, Ver. Staten) volgens de instructies van de fabrikant. De PVDF membranen waren verzadigd met 1% afgeroomde melk en geïncubeerd met antilichamen tegen verschillende proteolytische enzymen: polyclonale en monoclonale antilichamen in verdunningen van respectievelijk 1/4000 tot 1/8000 en 1/10. Na was-
 5 sen met 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) die 150 mM NaCl bevatte en 0,05 % Tween-20 (TBST) werd het membraan geïncubeerd met alkalische fosfatase geconjugeerd aan geit anti-konijn immunoglobuline serum of geit anti-muis (Bio-Rad Laboratoria, Richmond, Californië, Ver. Staten) 1/3000 verdund. Het PVDF
 10 membraan werd gewassen met TBST en het enzym antilichaam complex werd zichtbaar gemaakt door het membraan te incuberen in carbonaatbuffer (0,1 M NaHCO₃, 1,0 mM MgCl₂ (pH 9,8) met 1% (v/v) nitroblauw tetrazolium (30 mg/ml) in 70% dimethylformamide en 1% (v/v) 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfaat dinatrium-
 15 zout (15 mg/ml) in 100% dimethylformamide. Antilichamen werden verkregen van het Departement van Microbiologie, van de Rijksuniversiteit Groningen (14, 18, 27).

Detectie van peptidase activiteit op polyacrylamide gel

Eiwitten in het celvrije extract werden gescheiden op preparatieve gel elektroforese (7,5%). De gel werd vertikaal in 7 mm strips gesneden en daaropvolgend gewassen (2x) met 0,1 mM HEPES (pH 7) voor 10 minuten. De strips werden geïncubeerd in een 10 ml oplossing die 1 mM β -naftylamide sub-
 25 straat bevatte en verdund in 100 mM HEPES pH 7, gedurende 2 tot 60 minuten (afhankelijk van de activiteit) bij 37°. De peptidase activiteit werd zichtbaar gemaakt binnen 5 minuten na toevoeging van een 10 ml Fast Garnet GBC oplossing (2 mg/ml water) (Sarath et al.). In het alternatief, werd de peptidase
 30 activiteit bekeken in de gelstrips door de detectie van leucine in een gekoppelde enzymreactie waarin orthodianisidine

9301525

- wordt geoxydeerd tot een roodbruine kleur. De gelstrips werden gedurende 60 min. bij 37°C geïncubeerd in een 8,4 ml oplossing bevattende 9 ml 100 mM HEPES (pH 7,5), 160 µl van een 50 mM Leu-Leu of Leu-Leu-Leu oplossing, 80 µl 23,3 mM ortho-
- 5 dianisidine in 0,1 N zoutzuur, 80 µl 5000 units/ml peroxydase in 3,2 M ammoniumsulfaat en 80 µl 1 mg/ml L-aminozuuroxydase in 3,2 M ammoniumsulfaat.

Zintuigelijke test

- 10 Een mengsel bevattende 2 ml 10% (w/v) van een tryptisch afbraakprodukt van caseïne in 25 mM kaliumfosfaat pH 7 en 0,5 mg van eiwit uit celextract werd geïncubeerd gedurende 6 uur bij 30°C. De bitterheid van het caseïneprodukt werd organoleptisch geëvalueerd door een panel van 6 personen. Geen
- 15 verandering in bitterheid werd bitter genoemd, overblijvende bitterheid werd enigszins ontbitterd genoemd en geen bittere smaak werd volledig ontbitterd genoemd.

Gedeeltelijke zuivering van de verschillende peptidasen

- 20 De condities voor de zuivering op Mono-Q ionenwisselaar chromatografie middels FPLC werden bepaald als volgt: 4 mg celvrij extract (100 µl) werd op een Mono-Q HR 5/5 kolom gebracht (Pharmacia LKB, Uppsala, Zweden). De enzymactiviteit werd geëluëerd met een lineaire gradiënt van 0,15 tot 0,5 M
- 25 NaCl in 20 mM Tris hydrochloride (pH 8,0). De stroomsnelheid was 1 ml/min. en fracties van 1 ml werden opgevangen en getest op peptidase activiteit met verschillende (chromogene) peptiden.

30 Eiwitbepaling

Eiwitconcentraties werden bepaald met de Bio-Rad eiwitbepaling (Bio-Rad Laboratoria, Richmond, Cal., Verenigde Staten) met bovine serum albumine als standaard.

9301525

Chemicaliën en reagentia

Tenzij anders vermeld, bevatten alle aminozuren en peptide derivaten gebruikt in deze studie, de L-anomeren van aminozuren. Alle chemicaliën waren "reagent grade" en werden
5 verkregen van commerciële bronnen.

RESULTATEN

Screening met 178 Lactobacillus en Lactococcus stammen

Celvrije extracten van 178 Lactobacillus en Lactococcus
10 stammen, verdeeld over 13 verschillende soorten, werden op hun proteolytische activiteit getest onder gebruikmaking van de volgende substraten: Lys-pNA en Arg-pNA (voor aminopeptidase in het algemeen), Glu-pNA (voor glutamyl aminopeptidase), Pro-pNA (voor prolydase), Ala-Pro-pNA (voor X-prolyldipeptidyl
15 aminopeptidase) en Suc-Phe-pNa en MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (voor endopeptidase/proteïnase).

In fig. 1 worden de gemiddelde proteolytische activiteiten (in de figuur aangegeven als zwarte stippen) voor drie belangrijke substraten (Lys-pNA (Fig. 1A), Ala-Pro-pNA
20 (Fig. 1B) en MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (Fig. 1C)) weergegeven voor elke soort. Ook weergegeven zijn de maximum en minimum waarden. De resultaten laten duidelijk een grote variatie van proteolytische activiteit zien voor elke soort. Hoge activiteiten zijn gevonden, maar ook zeer lage activiteiten. Hetzelfde
25 gold voor de bepalingen met de andere substraten (resultaten niet weergegeven). De resultaten laten ook zien dat Lactobacillus helveticus de hoogst gemiddelde activiteit met betrekking tot alle drie de chromogene peptiden heeft. Hetzelfde is waar voor andere peptiden, met uitzondering van Suc-
30 Phe-pNA (resultaten niet weergegeven).

Om de ontbitteringseigenschappen van de Lactobacilli te bepalen, werden experimenten uitgevoerd met een bitter tryptisch digest van caseïne (zie materiaal en methode). Fig. 2 laat een aantal stammen zien die een tryptisch digest van
35 caseïne kunnen ontbitteren binnen 6 uur (geheel ontbitterd, zwarte balk; gedeeltelijk ontbitterd, grijze balk; en niet

9301525

ontbitterd, witte balk). In het bijzonder *Lactobacillus helveticus* stammen (20 stammen) en ook een aantal andere stammen (met name *Lactococcus* soorten (2 stammen) en *Lactobacillus casei* (5 stammen)), laten een significante
5 ontbitteringsactiviteit zien.

Vergelijking tussen de proteolytische activiteit van *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 en andere melkzuurbacteriën

Lactobacillus helveticus SBT 2171, 8 andere sterk
10 proteolytische *Lactobacillus* stammen en 2 *Lactococcus* stammen zijn verder onderzocht wat betreft hun peptidase en proteïnase activiteit.

De resultaten van de hydrolyserende activiteit op 21 substraten zijn samengevat in Tabel 2. De hoogste proteo-
15 lytische activiteiten zijn vet gedrukt. *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 heeft de hoogste activiteit voor 12 van de 21 substraten waaronder enkele interessante carboxypeptidase substraten. Verder is de stam SBT 2171 tevens een van de hoogste actieve stammen voor een aantal andere substraten. In
20 het bijzonder de activiteiten van peptidasen zijn het hoogst voor *Lactobacillus helveticus* SBT 2171: Leu-Leu-Leu, Lys-pNA, Leu-Leu, Lys-pNA, Leu-Leu en MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-PNA (S2586). Maar ook Ala-Pro-pNA en resorufin-caseïne worden door deze stam zeer goed gehydrolyseerd.
25 Gly-Phe- β NA, Lys-Ser-4M β NA, Phe-Pro-Ala- β NA, Pro-Arg- β NA en Ser-Met- β NA worden ook door *Lactobacillus helveticus* STB het best gehydrolyseerd.

Wanneer de proteolytische activiteit van *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 met de activiteit van startcultuur
30 *Lactococci* wordt vergeleken (*L. lactis* ssp. *cremoris* Wg2 en *L. lactis* ssp. *lactis* SK112), vallen een aantal significante verschillen op. Bij voorbeeld, *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 laat een vijf- tot zeventvoudig hogere activiteit voor Lys-pNA zien, een meer dan 90-voudig hogere activiteit voor
35 Pro-pNA en een bijna 10-voudig hogere activiteit voor MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA. Verder worden behalve Glu-Glu substraten alle

9301525

andere substraten het best gehydrolyseerd door stam SBT 2171. De resultaten laten duidelijk zien dat *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 de hoogste proteolytische activiteit van alle geteste stammen bevat, waaronder een aantal starter-
 5 cultures *Lactococci*.

Ontbitteringsexperimenten zijn uitgevoerd met een aantal hoog proteolytische stammen. De resultaten laten zien dat alle stammen een zekere ontbitteringsactiviteit bezitten, waarvan die van *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 de hoogste is
 10 (fig.3).

Aanvullende APIZYM experimenten werden uitgevoerd met geselecteerde *Lactobacilli* en *Lactococci*. Voor dit experiment werden 59 substraten onderzocht. De meeste stammen laten hydrolytische activiteit voor een breed spectrum van
 15 substraten zien. Beide APIZYM experimenten laten zien dat *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 een hydrolytische activiteit heeft voor een breed spectrum van substraten (Tabel 3).

20 Detectie van peptidase activiteit van *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 op polyacrylamide gel (zymogramkleuring)

Zymogramstudies werden uitgevoerd om te bepalen hoeveel exo-peptidases er aanwezig zijn in *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Wg2 werd gebruikt als referentiestam. Tabel 4 laat de R_F -waarde zien van de hydro-
 25 lyse activiteit, die na elektroforese van celvrij extract van beide stammen met verschillende substraten werden gevonden op een 7,5% polyacrylamide gel. De vergelijkbare resultaten werden gevonden voor *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Wg2. De R_F -waardes verschillen echter significant van die van *Lactobacillus*
 30 *helveticus* SBT 2171. Daarnaast hydrolyseert *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Wg2 maar 6 van de 11 substraten, terwijl *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 alle substraten in de gel hydrolyseert. Deze resultaten geven aan dat verschillende proteolytische enzymen aanwezig zijn in *Lactobacillus*
 35 *helveticus* SBT 2171 en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Wg2.

9301525

ZUIVERING

De huidige experimenten laten een proteolytische activiteit van verschillende *Lactobacillus* soorten zien. Vergelijkende studies voor peptidases zijn eerder uitgevoerd voor

5 *Lactobacillus casei* subspecies (1, 2, 9). Slechts een paar stammen van *Lactobacillus casei* en een paar enzymactiviteiten zijn beschreven terwijl in de onderhavige experimenten 178 stammen van 12 *Lactobacillus* soorten zijn vergeleken voor

10 proteolytische activiteit. Bovendien zijn ongeveer 13 verschillende peptidase en proteïnase activiteiten gemeten voor elke stam door gebruik te maken van meer dan 20 verschillende substraten en werden 60 additionele substraten gebruikt in een micro enzym APIZYM systeem. De resultaten van deze studie laten

15 duidelijk zien dat er een grote variatie aan proteolytische activiteit in de verschillende geteste *Lactobacillus* stammen bestaat. Hoog proteolytisch actieve stammen waren aanwezig, maar ook stammen met nauwelijks enige activiteit werden gevonden. Bovendien verschilt de proteolytische activiteit van

20 stammen van dezelfde soort significant (Bijvoorbeeld de meeste *Lactobacillus helveticus* stammen zijn hoog proteolytisch, terwijl *Lactobacillus helveticus* SBT 0351 nauwelijks of geen proteolytische activiteit vertoont (resultaten niet weergegeven). Er kan worden geconcludeerd, dat van de geteste

25 *Lactobacillus* en *Lactococcus*soorten, *Lactobacillus helveticus* het meest proteolytische soort is voor een breed spectrum van substraten. Maar ook de afname in bitterheid, als gezien na incubatie van het tryptisch β caseïne digest met celextracten van *Lactobacillus helveticus*, is significant hoger dan met andere melkzuurbacteriesoorten. Hoewel geen duidelijke

30 correlatie tussen een specifieke peptidase activiteit en ontbitteringsactiviteit kan worden gemaakt, is dit fenomeen waarschijnlijk te verklaren door een afname van bittere peptiden in het mengsel.

Verdere studie met een selectie van een aantal hoog

35 proteolytische *Lactobacillus* stammen laat duidelijk zien, dat *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 het meest proteolytisch is.

9301525

- Deze stam heeft de hoogste proteolytische activiteit voor: Lys-pNA, Arg-pNA, Glu-pNA, His- β NA, Leu-Leu, Leu-Leu-Leu, pro-pNA en Pro-Ala, MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA, Bzl-Cys-pNA, Z-Phe-Ala, Z-Ala-Ile en Hyp-Lys. Daarnaast heeft deze stam zeer hoge
- 5 activiteiten gemeten voor andere substraten zoals Ala-Pro-pNA en resorufine-caseïne. Het lijkt erop dat het algemene aminopeptidase van stam SBT 2171 ook in staat is Pro-pNA te hydrolyseren. Dit gegeven was nog niet eerder bekend voor *Lactobacillus helveticus*.
- 10 Er kan worden geconcludeerd dat *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 een hogere proteolytische activiteit laat zien dan de geteste *Lactococci* stammen. Dit is een interessante conclusie aangezien voor het rijpen van de meeste kazen (met uitzondering van Emmenthaler en Gruyère) (19) voornamelijk
- 15 *Lactococcus* startercultures worden gebruikt, hetgeen een grote bijdrage impliceert van deze stammen aan proteolyse. Het moge duidelijk zijn dat de ontwikkeling van een stam met superieure proteolytische activiteiten zoals *Lactobacillus helveticus* het rijpen van kaas significant zal kunnen beïnvloeden. De hoge
- 20 proteolytische activiteit van *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 kan een gevolg zijn van individuele enzymen, maar ook onbekende expressie of regulatoire factoren kunnen in het spel zijn.

9301525

CONCLUSIES

1. Lactobacillus Helveticus SBT 2171 of een mutant daarvan, met de volgende eigenschappen; hoge proteolytische activiteit en ontbitteren van een tryptisch hydrolysaat van caseïne in zes uur.
- 5 2. Lactobacillus Helveticus SBT 2171 zoals gedeponeerd onder het nummer CBS404.93.
3. Gebruik van een micro-organisme volgens conclusie 1 of 2 in een fermentatieproces.
4. Gebruik volgens conclusie 3, waarbij het fermentatie-
10 proces wordt toegepast bij de rijping van kaas.
5. Recombinant DNA molecule dat tenminste codeert voor tenminste een deel van een micro-organisme volgens conclusie 1 of 2, van welk recombinant DNA molecule het coderende deel onder stringente omstandigheden hybridiseert met het DNA van
15 het gedeponeerde micro-organisme met het nummer CBS404.93.
6. Gebruik van een micro-organisme volgens conclusie 1 of 2, bij de proteolyse van biologisch actieve peptiden.
7. Farmaceutische formulering die een micro-organisme volgens conclusie 1 of 2, alsmede een farmaceutisch acceptabele
20 drager omvat.
8. Proteolytisch enzym afkomstig van een micro-organisme volgens conclusie 1 of 2.
9. Gebruik van tenminste een enzym volgens conclusie 8, voor de proteolyse van biologisch actieve peptiden.
- 25 10. Farmaceutische formulering die tenminste een enzym volgens conclusie 8, alsmede een farmaceutisch acceptabele drager omvat.
11. Werkwijze voor het fermenteren van een van melk afkomstig preparaat, waarbij een micro-organisme volgens conclusie 1 of
30 2 in cultuur wordt gegroeid in aanwezigheid van het preparaat, onder voor Lactobacillus reguliere groeiomstandigheden.

9301525

12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarbij het preparaat verse kaaswrongel is.
13. Antilichamen opgewekt tegen een of meerdere bestanddelen van een micro-organisme volgens conclusie 1 of 2.
- 5 14. Antilichamen volgens conclusie 13, die specifiek zijn voor een organisme volgens conclusie 1 of 2.

9301525

LITERATUUR

1. Arora, G., Lee, B.H. and Lamoureux, M. 1990a. Characterization of enzyme profiles of *Lactobacillus casei* species by a rapid API ZYM system. J. Dairy Sci. 73: 264-273.
2. Arora, G. and Lee, B.H. 1990b. Comparative studies on peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. J. Dairy Sci. 73: 274-279.
3. Arora, G. and Lee, B.H. 1991. Purification and characterization of aminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG. J. Dairy Sci. 75: 700-710.
4. Atlan, D. Laloi, P. and Portalier R. 1990. X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2174-2179.
5. Bockelmann, W., M. Fobker and M. Teuber. 1991. Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. Int. Dairy J. 1: 51-66.
6. Bockelmann, W., Schulz, Y. and M. Teuber. 1992. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Int. Dairy J. 2: 95-108.
7. De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharp. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 23: 130-135.
8. Doi, E., Shibata D. and Matoba T. 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. Anal. Biochem. 118: 173-184.
9. El Abboudi, M., El Soda, M., Pandian S., Barreau, M., Trepanier, G. and Simard, R.E. 1991. Peptidase activities in debittering and nondebittering strains of *Lactobacilli*. Int. Dairy J. 1: 55-64.
10. El Soda, M. A. 1993. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. submitted for publication (FEMS) for the 4th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Noordwijkerhout, The Netherlands.
11. Elleman, T. C. 1974. Aminopeptidases of Pea. Biochem. J. 141: 113-118.
12. Exterkate, F.A. 1975. An introductory study of the proteolytic system of *Streptococcus cremoris* strain HP. Neth. Milk Dairy J. 29: 303-318.

9301525

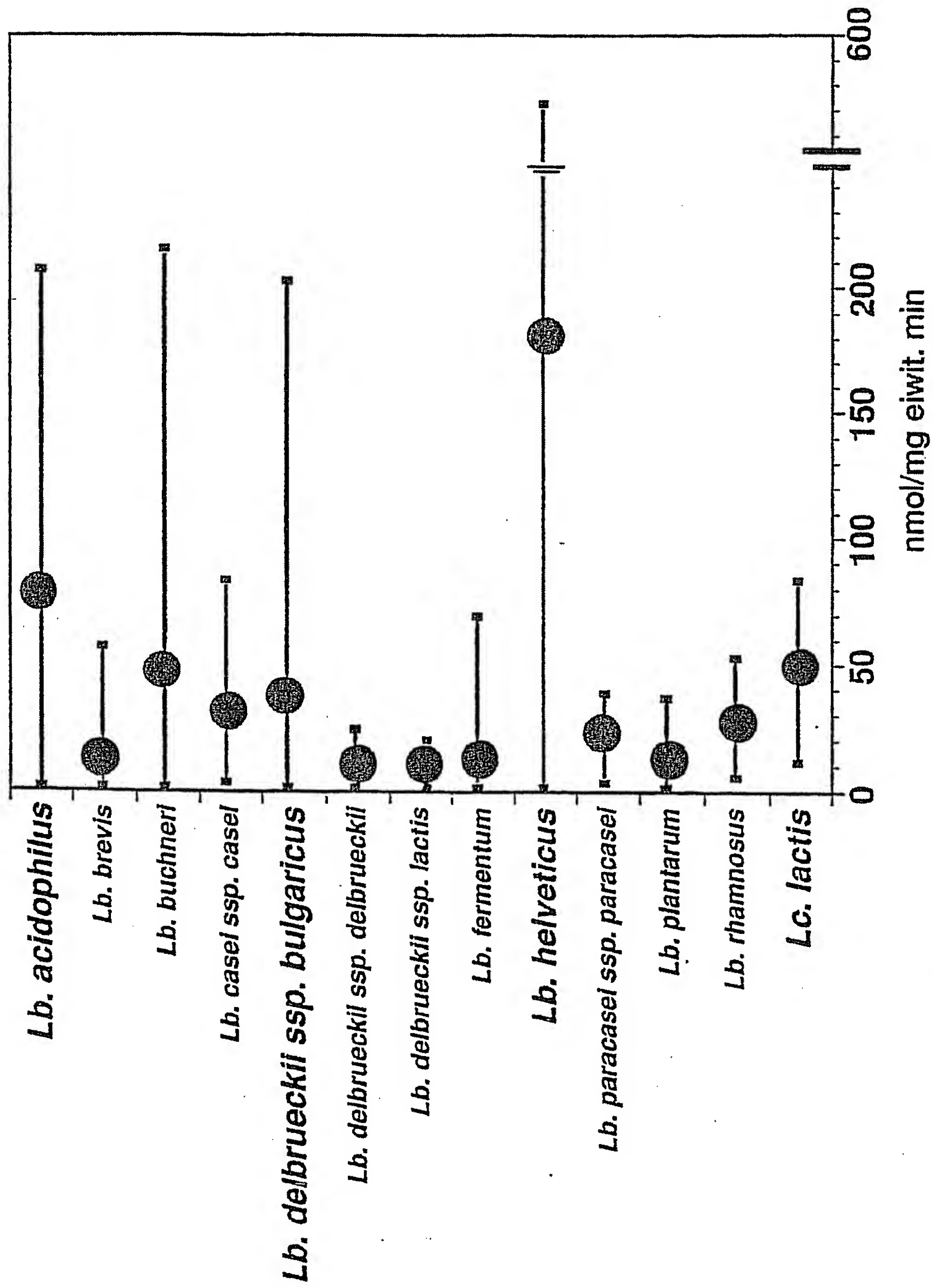
13. Exterkate, F.A. 1990. Differences in short peptide-substrate cleavage by two cellenvelope-located serine proteinases of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* are related to secondary binding specificity. 33: 401-406.
14. Haandrikman, A.J., J. Kok, H. Laan, S. Soemitro, A.M. Ledebor, W.N. Konings and G. Venema. 1989. Identification of a gene required for maturation of an extracellular serine proteinase. J. Bacteriol. 171: 2789-2794.
15. Hugenholtz, J., Exterkate, F.A. and W.N. Konings. 1984. The proteolytic systems of *S. cremoris*: an immunological analysis. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1105-1110.
16. Khalid, N.M. and Marth, E.M. 1990. Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. System Appl. Microbiol. 13: 311-319.
17. Khalid, N.M. and E.H. Marth. 1990. Purification and partial characterization of a X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNF~Z 32. Appl. Environ. Microbiol. 55: 381-388.
18. Laan, H., E.J. Smid, L. de Leij, E. Schwander and W.N. Konings 1988. Monoclonal antibodies to the cell wall associated proteinase of *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2250-2256.
19. Law, B.A. 1984. Flavour development in cheeses, p. 187-208. In F.L. Davies and B.A. Law (ed.), Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Elsevier Appl. Sci., London.
20. Law, B.A. 1987. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In P.F. Fox (ed.), Cheese: chemistry, physics and microbiology. Elsevier Appl. Sci., London.
21. Machuga, E.J. and D.H. Ives. 1984. Isolation and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus acidophilus* R-26. Biochem. Biophys. Acta 789: 26-36.
22. Marth, E.H. 1963. Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese ripening. A review. J. of Dairy Sci. 46: 869-890.
23. Miyakawa, H., S. Kobayashi, S. Shimamura and M. Tomita. 1991. Purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBU-147. J. Dairy Sci. 74: 2375-2381.
24. Naes, H. and Meyer, J.N. 1992. Purification and N-terminal amino acid sequence determination of the cell-wall-bound proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. J. Gen. Microbiol. 138: 313-318.

9301525

25. Peterson, S.D. and Marshall, R.T. 1990. Non starter Lactobacilli in Cheddar cheese. A review. J. Dairy Sci. 73: 1395-1410.
26. Sarath, G 1989. Proteinase assay methods. In Proteolytic enzymes: A practical approach. Ed. Beyond, R.J. and Bond, J.S. IRL Press, Oxford England.
27. Tan, P.S.T., M.-P. Chapot-Chartier, K.M. Pos, M. Rousseau, C.-Y. Boquien, J.-C. Gripon and W.N. Konings 1992. Localization of peptidases in Lactococci. Appl. Environ. Microbiol. 58: 285-290.
28. Tan, P.S.T., Poolman, B and Konings W.N. 1993. The proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. A review. J. Dairy Res. 60: 269-286.
29. Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: An overview. J. Dairy Sci. 76: 329-350.
30. Wohlrab, Y. and Bockelmann W. 1992. Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Int. Dairy J. 2: 345-363.

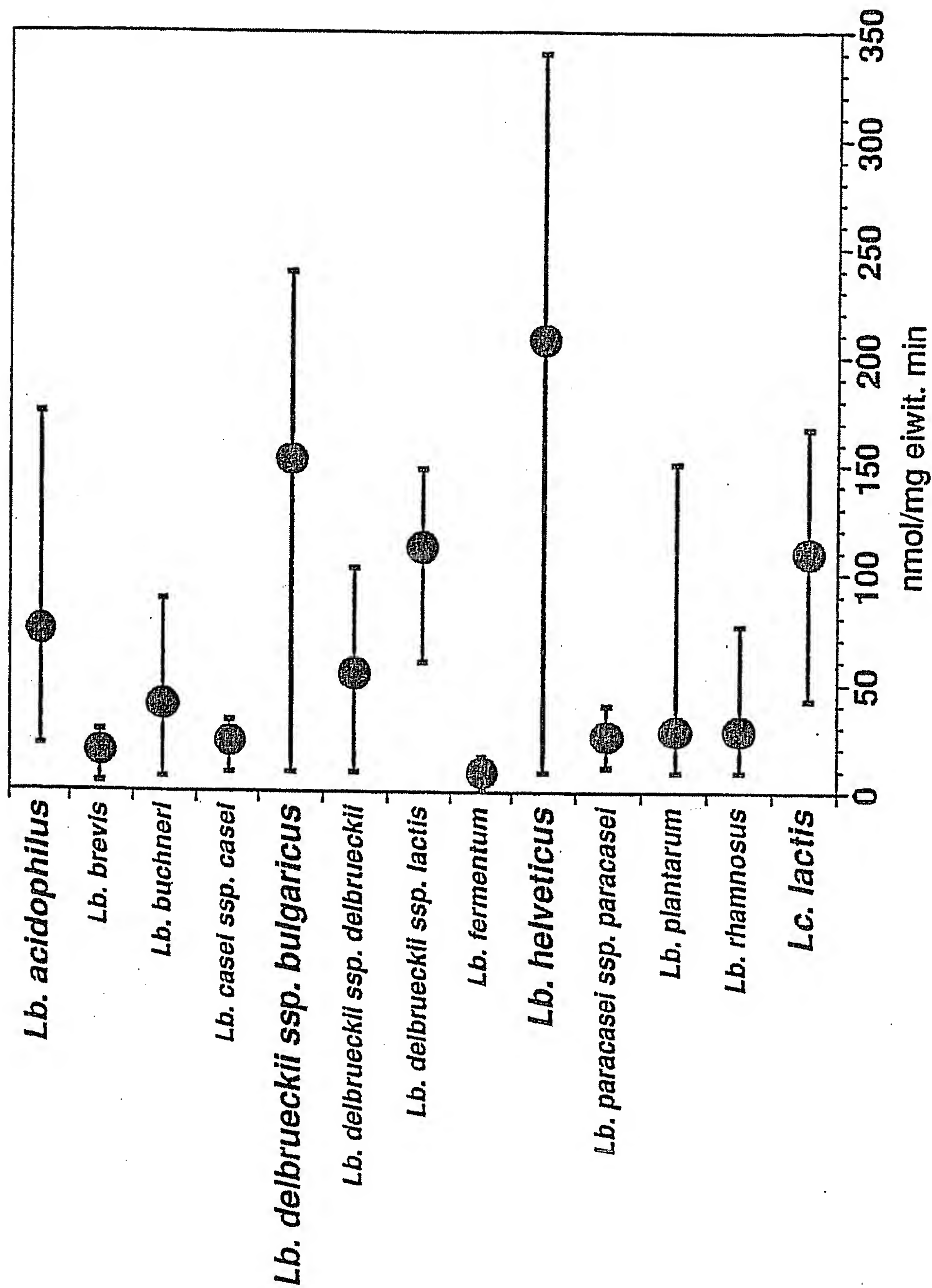
9301525

9301525



Gemiddelde proteolytische activiteit van verschillende Lactobacillus en Lactococcus spp. voor Lijs-pNA

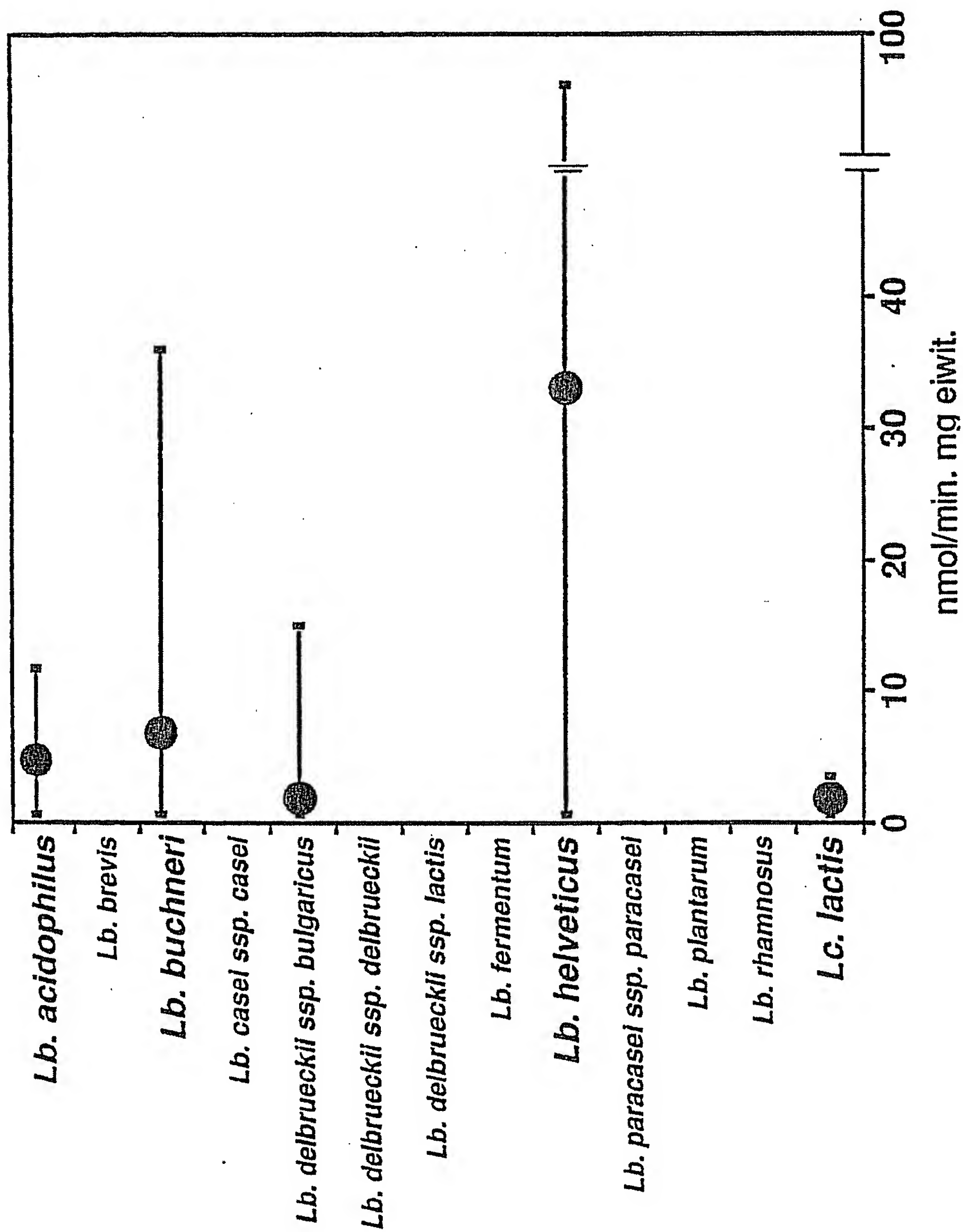
FIG. 1A



Gemiddelde proteolytische activiteit van verschillende Lactobacillus en Lactococcus spp. voor Alu-Pro-pNA

FIG. 1B

9301525



Gemiddelde proteolytische activiteit van verschillende Lactobacillus en Lactococcus spp. voor Meo-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA

FIG. 1C

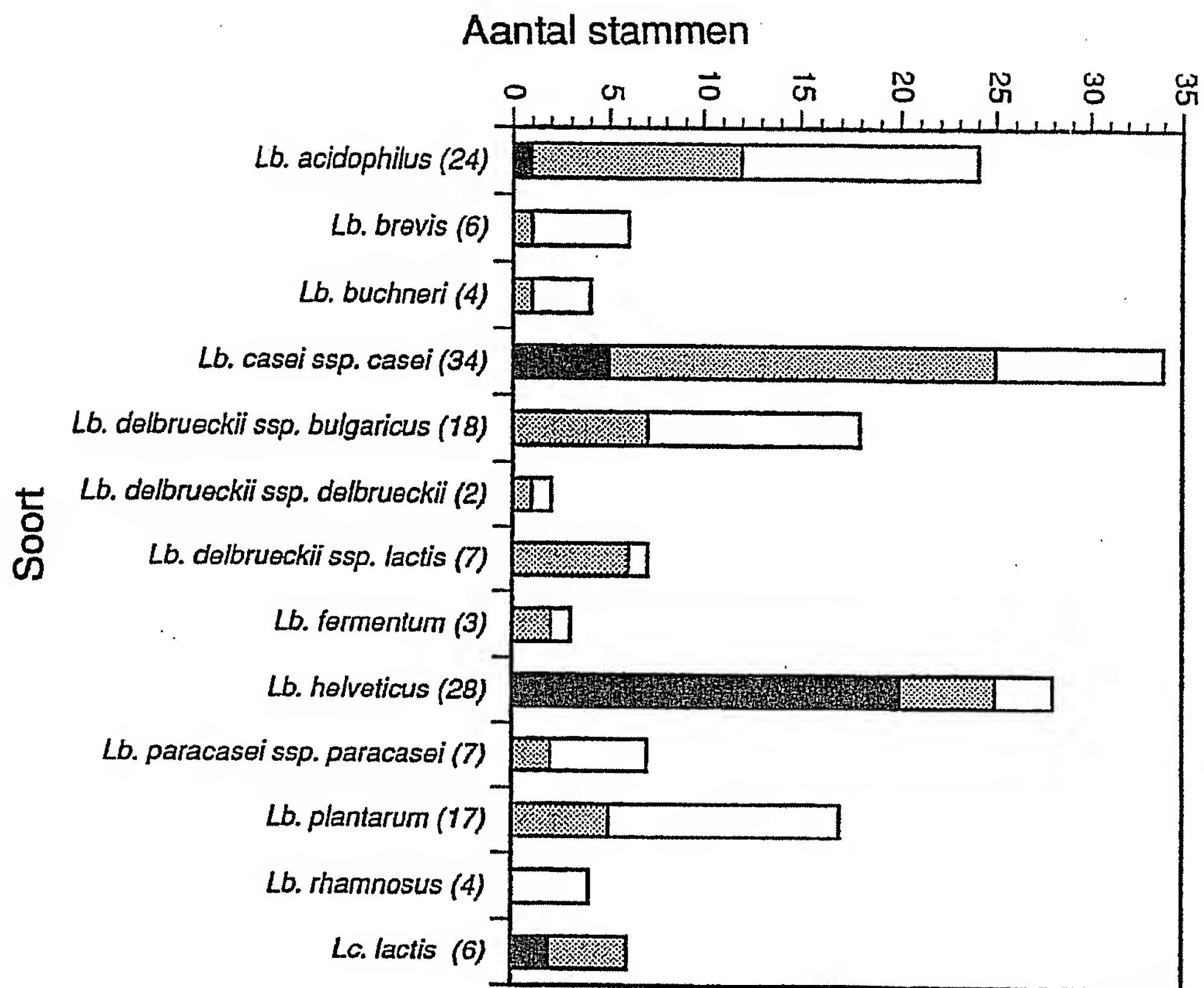


FIG. 2

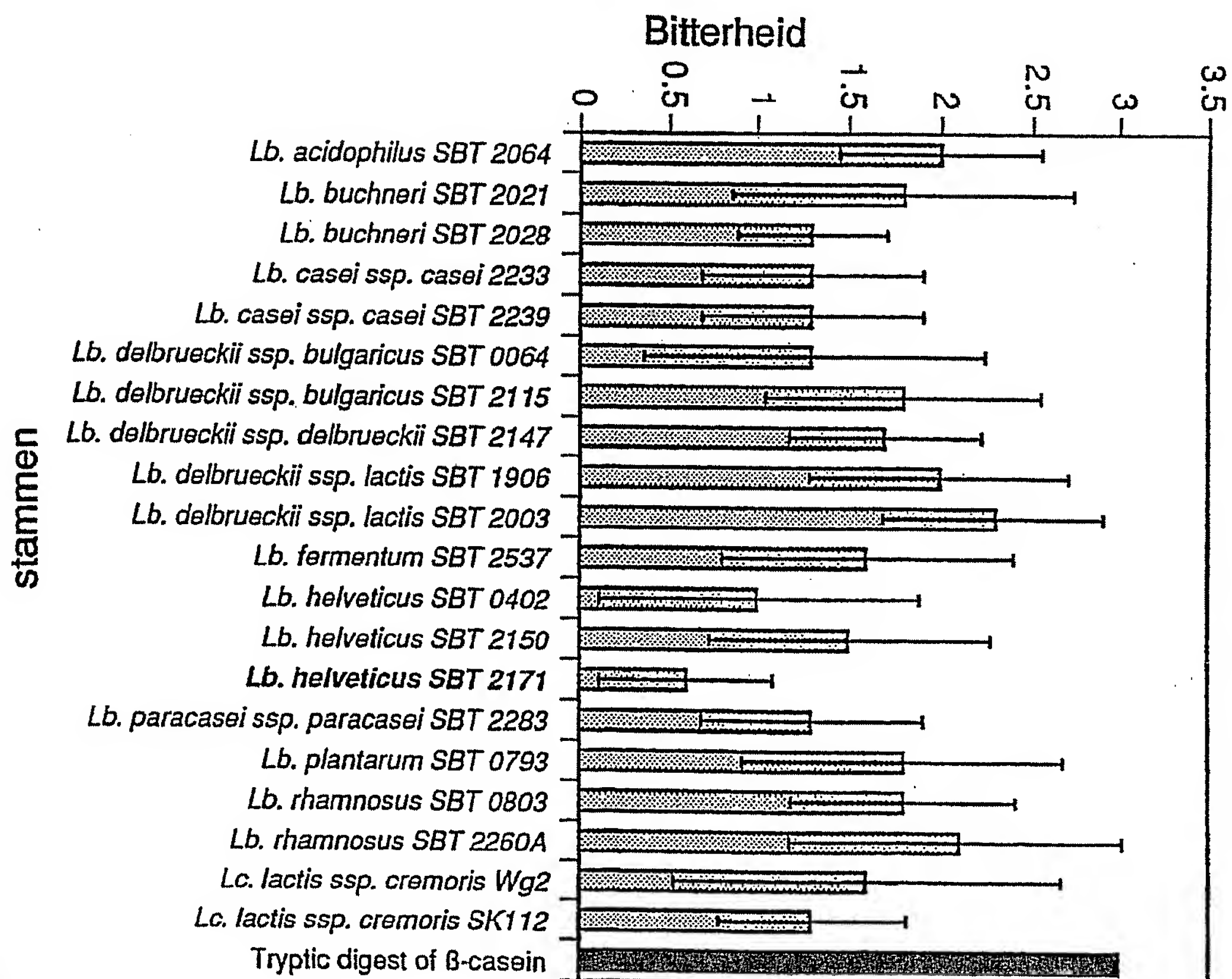


FIG. 3

9301525